

Zárójelentés – OTKA 061518

1) Autoantigén epitópok azonosítása

Autoimmun betegségekben olyan autoantitestek és autoreaktív T-sejtek jelennek meg, amelyek károsítják a beteg saját antigénjeit, szöveteit. A kutatások nagy része fehérjeszinten kívánja azonosítani ezen antigéneket, a mi célunk azonban a peptidepitópok megtalálása, aminek fontos diagnosztikus jelentősége lehet.

1.1) Citrát szintáz epitópok

A humán citrát szintáz enzimmel nagymértékben (39%) homológ *E. coli* citrát szintáz enzim ismert 3 dimenziós szerkezete és epitóppredikciója alapján kiválasztottuk a fehérje felszíni, feltehetőleg antigéndetermináns szakaszait. A tűhegyen szintetizált átlapoló peptidekkel végzett módosított ELISA kísérletekben különbségeket detektáltunk az IgG és IgM típusú autoantitestek peptidkötődésében.

Az átfedő szintetikus peptidek segítségével vizsgáltuk a citrát-szintáz specifikus IgG és IgM ellenanyagok jelenlétét szisztémás autoimmun betegségben szenvedők, szívtranszplantált páciensek és egészséges kontrol személyek szérumban. Noha a szérum-ellenanyagok által felismert peptidek nagyrészt azonosak voltak, az autoimmun betegek és a szívtranszplantáción átesett páciensek szérumban olyan ellenanyagok jelenléte is detektálható volt, melyek a kontrol szérumokban nem voltak jelen. (Nyárády et al, 2006; Czömpöly et al, 2008)

Az orvos/biológus partnerek a további epitóptérképezést phage display formájában kívánták folytatni, így az együttműködés megszakadt.

1.2) Autoantigén desmoglein epitópok azonosítása

Kutatócsoportunk a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikájával új együttműködés keretében az autoimmun hólyagképződéssel járó bőrbetegségekkel (pemphigus vulgaris (PV), pemphigus foliaceus (PF), bullosus pemphigoid(BP)) kezdett foglalkozni. Ezen betegségekben a keratinociták a hámon belül elveszítik egymással való kapcsolatukat. A kórkép oka az, hogy a dezmoszómális cadherin molekulák (desmoglein 3 (Dsg3), desmoglein 1 (Dsg1) pemphigusokban), illetve a hemidezmoszómális BP180 és BP230 fehérjék (pemphigoidokban) ellen patogén autoellenanyagok képződnek, melyek megtámadják a fenti adhéziós molekulákat, amelyek a keratinocitákat egymáshoz, illetve a bazális membránhoz rögzítik.

Célunk az immunológiai homunculus részeként jelenlévő, természetes, fiziológiás autoantitestek epitópspecifikitásának megkülönböztetése az autoimmun betegségekben keletkező patológias autoantitestek epitópspecifikitásától.

A pemphigus és a pemphigoid pathogenezisében egyaránt fontos szerepe van az autoreaktív T-sejtes immunválasznak is. E betegségekben a T-sejtek a desmoglein, illetve BP180 fehérjék extracelluláris doménjein belül elhelyezkedő epitópokat ismernek fel (MHC kontextusában), és különféle citokineket termelnek (pl. interferon- γ -t). A T-sejt epitóp térképezés peptidek segítségével hasznos eszköze a biomedicinális alkalmazásoknak, a peptid antigének a T-sejt válasz detektálásában a rekombináns fehérjékhez hasonló hatékonyságot mutatnak, de lényegesen alacsonyabb költséggel, gyorsabb előállítással.

A desmoglein fehérjék harmadlagos szerkezete nem ismert, ezért a lehetséges epitóppeptidek kiválasztására *predikciós* módszereket alkalmaztunk, feltételezve, hogy a B-sejt epitópok elsősorban a fehérje felszínén, β -kanyar környékén elhelyezkedő peptidszakaszok.

A predikciós vizsgálatok eredményei alapján 45 Dsg1 és 47 Dsg3 pentadekapeptidet készítettünk el, melyek a két fehérje extracelluláris doménjének nagy részét lefedik, és egymással 5 aminosavban átfednek. Kontrollként irreleváns peptideket készítettünk. A desmoglein peptideket 2-3 példányban „tűhegyes” *szintézissel* állítottuk elő Fmoc/tBu stratégiával. Az oldallánc védőcsoportok lehasítása során a peptidek kovalensen a tűhegyekhez kapcsolódva maradnak, és így használjuk a peptideket módosított ELISA kísérletekben.

Betegek: A Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán ELISA és immunfluoreszcencia vizsgálattal diagnosztizált, Dsg1 fehérje pozitív betegek szérumát vizsgáltuk, a betegek közül hat PF-ban, egy mucocután PV-ban szenved (Dsg1 és Dsg3 pozitív) (22-88 év, 3 nő, 4 férfi).

A módosított *ELISA* módszerrel a tühegyekhez kapcsolódó, átlapoló desmoglein 1 és 3 peptideken vizsgáltuk a betegek szérumát. A tühegyeken a peptidek mellett fennmaradó nem-specifikus kötőhelyeket blokkoltuk, majd a betegek hígított szérumába helyeztük a tüket. A szérum ellenanyagok kötődését humán IgG-t felismerő, peroxidáz enzimmel jelzett egér ellenanyaggal, *o*-fenilén-diamin/H₂O₂ detektáló rendszerrel mutattuk ki. Mind a Dsg1, mind a Dsg3 peptid blokkon kétszer végeztük el az *ELISA*-t. Elkezdtük a Dsg3 pozitív PV betegek szérumának vizsgálatát is.

A Dsg1-pozitív betegek szérum autoantitestjeivel elvégzett *ELISA*-k alapján megállapítottuk, hogy az egészséges kontrollhoz képest a betegszérumok desmoglein specifikus autoellenanyag-tartalma általában magasabb, ezen belül öt olyan epitóprégiót találtunk a Dsg1 fehérje extracelluláris doménjein belül, amelyeket hét beteg közül legalább öt szérum-ellenanyagai szignifikánsan erősebben ismertek fel (Szabados et al, 2010). A talált epitóprégiók közül három a Dsg1 fehérje 1-400-as szakaszán, ezen belül kettő az 1-160-as szakaszon helyezkedik el, amely szakaszokat az irodalom szerint a legtöbb desmoglein specifikus ellenanyag ismer fel. A fehérje N-terminális doménje felelős elsősorban a sejtek közötti adhézióért, így a patológiás autoellenanyagok az erre specifikus ellenanyagok közül kerülnek ki. A 400-500-as szakaszon talált két további epitópszakaszon általában ritkább az autoellenanyag felismerés. A Dsg3 pozitív szérumok esetén szintén találtunk az autoantitestek által felismert epitóprégiókat.

B- és T-sejt desmoglein epitópeptidek szintézise

Az immobilizált peptidek *ELISA* eredményei alapján megkezdtük a talált epitóprégiók szintézisét egyedi peptidek formájában, Cys-nel meghosszabbítva, későbbi, makromolekulás hordozóhoz, illetve maleimid-funkcionalizált *ELISA* lemezhez való konjugálás céljából.

Irodalmi adatok alapján előállítottuk három Dsg3 T-sejt epitópeptid rövidített, átlapoló változatait (az első és a harmadik extracelluláris doménből) a funkcionális epitóp felderítése céljából; további peptidek szintézise folyamatban van.

A B- és T-sejt epitópeptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő Fmoc/tBu stratégiával, Rink-amid MBHA gyantán, a gyantáról való lehasítás után RP-HPLC-vel tisztítottuk, tömegspektrometriával és aminosav analízissel azonosítottuk, tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltuk.

Autoantigén T-sejt epitóp vizsgálata pemphigus vulgarisban

Két pemphigus vulgarisban szenvedő és két egészséges donor perifériás vér monomorfonukleáris sejtjeit (PBMC) izoláltuk Ficoll gradiens centrifugálással, majd a Dsg3 első doménjéből származó átlapoló peptidekkel inkubáltuk a sejteket, 25, illetve 50 μ M-os koncentrációban. 20, illetve 90 óra után a sejtek felülúszóit begyűjtöttük, majd a termelődött interferon- γ -t (IFN γ) szendvics *ELISA*-val mutattuk ki. Röviden: humán IFN γ -t felismerő egér IgG-vel („capture antibody”) érzékenyítettük az *ELISA* lemezt, a nem specifikus kötőhelyek blokkolása után a sejtek felülúszóit, illetve ismert koncentrációjú standard IFN γ sorozatot adtunk a rendszerhez, majd mosás után biotinnal jelzett, IFN γ -specifikus egér ellenanyagot. A kötődést peroxidáz enzimmel konjugált avidin segítségével, *o*-fenilén-diamin/H₂O₂ detektálórendszerrel mutattuk ki, és számítottuk a termelődött IFN γ mennyiségét.

Megállapítottuk, hogy a betegek PBMC-i szignifikánsan nagyobb mértékben termeltek IFN γ citokint, mint az egészséges donorok sejtjei. Leghatékonyabban a T-sejt epitópeptid középső szakasza stimulálta a sejteket. Nagyobb peptidkoncentrációjú és hosszabb ideig tartó stimuláció esetén a citokintermelés gyengébb volt, valószínű, hogy a peptidek kismértékben toxikusak a sejtekre (Uray et al, 2010).

2.1) Autoantitest termelő B-sejtek aktivációjának gátlása

Autoimmun betegségekben szerepet játszó, autoantitest termelő B-sejtek aktivációjának gátlására olyan peptidkimérákat terveztünk, melyek e sejtek felszínén található Fc receptorokhoz

kötődnek nagy affinitással és effektor funkciót váltanak ki. A peptidkimérák a kötődésben résztvevő, szekvenciálisan távoli, de térben közeli peptidszakaszokból állnak.

A humán IgG Fc 229-303 régióján belül előkísérleteink, valamint irodalmi, röntgendiffrakciós adatok alapján talált négy peptidszakasz különböző hosszúságú változatait állítottuk elő.

Egér IgG kapocsrégiójából származó, irodalomból ismerten Fc-receptorhoz kötődő, aktiváló peptideket, valamint saját korábbi kutatásaink alapján Fc-receptorhoz kötődő, humán IgG FC régiójából származó peptideket szintetizáltunk a szilárd fázisú peptidszintézis módszerével. A peptideket egyrészt polilizin gerincű, elágazóláncú polimerhez (SAK) konjugáltuk tioéter kötéssel, másrészt egy peptidet MBS kapcsolószerrel avidinhez kapcsoltunk. Az elágazóláncú polimerhez való konjugálás célja a peptid egy molekulán belül több másolatban történő szerepeltetése, ami a B-sejtek Fc receptoraihoz kötődéskor keresztkötést hoz létre a receptorok között, ezáltal aktiválja a sejtet, amely módszerrel korábban sikeresen aktiváltunk MonoMac sejteket, tumor nekrozis faktor termelést indukálva. Az avidinhez kovalens kötéssel történő konjugálás egy új kísérleti módszer, ily módon a peptiddel konjugált avidinhez biotinnal módosított, más specifikus peptidek kapcsolhatók másodlagos kötéssel, ezáltal olyan struktúra jön létre, amelyben két különböző peptid (B-sejt epitóp és Fc receptor ligandum) egyidejűleg több példányban szerepel (Uray et al, 2008).

2.2) Peptidek szintézise autoantitest termelő B-sejtek antigén-specifikus komplement-aktiválására

Korábbi terveinkkel ellentétben azt találtuk, hogy az IgG Fc peptidfragmensek valószínűleg nem képesek arra, hogy szelektíven gátolják a B-sejtek plazma-sejtté valóérését. Ezért a továbbiakban IgG Fc peptideket, komplement-aktiváló peptideket illetve autoantigén epitópokat tartalmazó konjugátumaikat olyan céllal állítjuk elő, hogy az Fc γ I vagy Fc γ III receptorhoz kötődjenek, és fagocitózist vagy ellenanyag-függő sejtes citotoxicitást indukáljanak, illetve antigénspecifikusan aktiválják a komplementrendszert.

Irodalmi adatok alapján előállítottunk egy biotinilált HIV gp140 peptidet, mellyel sikeresen aktiváltuk a komplement-rendszert. A peptid aggregációra hajlamos, oldékonysága gyenge, szintézise és tisztítása nehézségekbe ütközik, ezért további vizsgálatok céljára új peptidsorozatot állítottunk elő. E peptidekben a kötődésben feltehetőleg részt nem vevő, β -redőzött réteg képzésére hajlamos C-terminális részét szisztematikusan rövidítettük, valamint a vízoldékonyságot elősegítő Ttds távtartót (1. 3. rész) építettünk a biotin és a peptid közé.

3) Peptidek oldhatóságának növelése

Erősen aggregálódó, következésképpen rosszul oldódó IgG és egyéb peptidek biotinilálása és oldhatóbbá tétele céljából olyan vegyületeket állítunk elő, melyek biotint és oligo-etilénglikolt tartalmaznak, és egy lépésben peptidekhez/fehérjékhez kapcsolhatók.

Kétféle konstrukciót állítottunk elő. Egyik esetben etilén-diamint és tetraetilénglikoldikarbonsavat használtunk (EDA-TEG) (Bartos et al, 2009a), másik esetben 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint és borostyánkőssavat (Ttds) (Bartos et al, 2009b). Mindkét reagens alkalmazható mind Boc, mind Fmoc stratégiájú peptidszintézisben, és több példányban egymás után kapcsolhatók. Vizsgáltuk biotinnal és különböző távtartókkal jelzett IgG peptidek vízoldékonyságát, és azt találtuk, hogy különösen a több példányban alkalmazott Ttds több mint egy nagyságrenddel javítja az aggregálódó, biotinilált peptidek oldhatóságát vízben.

A Ttds távtartó molekulát a Kutatócsoportban folyó egyéb kutatások során is alkalmaztuk már az oldékonyság és flexibilitás fokozására.

A kutatási témában a kutatás időtartama alatt megjelent tudományos közlemények

a) Bartos Á, Hudecz F, Uray K: A new water soluble 3,6,9-trioxaundecanedioic acid based linker and biotinylating reagent. *Tetrahedron Letters* **50**: 2661-2663 (2009)

b) Bartos Á, Uray K, Hudecz F: New biotin derivatives for labelling and solubilizing IgG peptides. *Biopolymers: Peptide Science* **92**: 110-115 (2009)

Czömpöly T, Olasz K, Nyárády Z, Simon D, Bovári J, Németh P: Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 7(6):463-467 (2008)

Nyárády Z, Czompoly T, Bősze S, Nagy G, Petrohai A, Pál J, Hudecz F, Berki T, Németh P.: Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Molecular Immunology* **43**:830-838 (2006)

Szabados H, Bősze Sz, Blazsek A, Silló P, Kárpáti S, Hudecz F, and Uray K: B-Cell Epitope Mapping of Immunodominant Proteins in Pemphigus Vulgaris: rediction, Synthesis, and Immunoserological Evaluation. In: *Peptides 2010* (Proceedings of the 31st European Peptide Symposium), Lebl M, Meldal M, Jensen KJ, Hoeg-Jensen T (Editors) European Peptide Society, p 474-75 (2010)

Uray K, Magyar A, Bartos Á, Sármay G, Hudecz F.: Fc-gamma receptor binding peptide chimeras and conjugates against autoimmune diseases, *Drugs of the Future* 33, Suppl. A, 235, 2008

Uray K, Marschalkó M, Szabados H, Blazsek A, Hudecz F, Kárpáti S, and Bősze Sz: T-Cell Epitopes in Autoimmune Bullous Skin Disorders. In: *Peptides 2010* (Proceedings of the 31st European Peptide Symposium), Lebl M, Meldal M, Jensen KJ, Hoeg-Jensen T (Editors) European Peptide Society, p 476-77 (2010)